深绿木霉中碳代谢抑制因子 CRE1 功能特性研究*

李佩忆，周于聪，李雅乾**，陈捷

（上海交通大学农业与生物学院，农业部都市南方重点试验室 上海 200240）

摘要：木霉菌(*Trichoderma* spp.)是一种广泛存在于土壤及植物根系生境中的丝状真菌，具有拮抗植物病原真菌和促进植物生长的双重功效。碳代谢抑制子 CRE1 全局性调控细胞生长代谢过程，保障木霉在不同生境中的存活及拮抗病原菌特性。比较深绿木霉（*T.atroviride*）T23 及其 Cre1 突变株（T23Δ*cre1*）在不同培养基中的生长和代谢特性，结果表明：*cre1* 基因沉默后，T23Δ*cre1* 较 T23 菌丝生长变慢，产孢滞后且降低一个数量级，*cre1* 对菌丝生长和产孢的调控依赖于培养基组分。此外，*cre1* 基因抑制几丁质酶、β-1,3-葡聚糖酶基因转录，区别性调控部分次级代谢合成的非核糖体肽合成酶 NRPS 和聚酮合成酶 PKS 基因的表达。综上，碳代谢因子 CRE1 作为一个多效性的转录调控因子，抑制细胞壁降解酶和代谢产物合成相关的基因表达，赋予木霉菌在环境中的适应性和竞争性，是深绿木霉 T23 生长的必要因子。

关键词：深绿木霉 T23；碳代谢抑制因子 CRE1；生长；酶活特性；次级代谢合成基因

木霉菌是自然界普遍存在的一类丝状真菌，在生物防治和工业领域广泛应用，产生巨大的经济效益。生防木霉菌主要通过重寄生，如分泌细胞壁降解酶，如几丁质酶（chitinases）、葡聚糖酶（β-1,3-glucanases）、胞外蛋白酶等，和多样的抗菌活性代谢产物，如抗菌肽，聚酮类，萜烯类等多种拮抗因子共同防御植物病原菌[1-2]。

碳代谢抑制因子 CRE1 是 C2H2 型锌指结构的转录调控因子，编码 402 个氨基酸的蛋白，分子量 43.6KDa，对于木霉的生长和代谢具有全局性调控作用[3]。目前研究多集中在里氏木霉中碳代谢因子 *cre1* 调控多种水解酶活性，实现其高效表达，而对于生防深绿木霉中 Cre1 如何调控次级代谢产物及其基因合成鲜有

---

*国家自然科学基金（31201557），上海市自然科学基金（12ZR1414100），高等学校博士学科点新教师专项科研基金（20120073120070）资助项目

**通讯作者，E-mail：lauren@sjtu.edu.cn

报道。研究表明：里氏木霉中 CRE1 对几丁质酶 *ech42*、纤维素酶 *cbh1*、木聚糖酶 *xyn1* 和 *xyn2* 基因在转录水平存在直接调控[4-5]。里氏木霉 CRE1 蛋白通过结合水解酶 *ech42* 结构基因上游启动子调控区域两个单一位点，特征序列是 5'-'SYGGRG'-3'，抑制重寄生机制相关的蛋白结合区[6]。此外，碳代谢抑制因子 CRE1 对基因表达调控依赖于营养成分，RNA-Seq 测序结果表明，以纤维素为碳源的培养基中，里氏木霉的 CRE1 上调了 268 个基因的表达，85 个基因表达受到抑制，而在高浓度的葡萄糖培养环境中，251 个基因上调，230 个基因受到抑制，被调控的基因大多是与营养元素转运和氧化代谢相关的酶和蛋白以及转录因子等的编码基因[7]。

基因组学揭示了木霉菌含有大量次级代谢合成及修饰的基因簇，如非核糖体合酶（NRPSs），聚酮合酶（PKSs），萜烯合酶（TPSs）等合成酶等，负责合成木霉菌多样的次级代谢产物，如胶霉毒素(gliotoxin)、6-Pentyl 吡喃酮(6-PP)、绿胶霉素(viridin)、木霉菌素（trichodermin）和抗菌肽等产物[8-9]。里氏木霉中包含 10NRPS 和 11PKS 基因簇，而深绿木霉包含多达 18PKS 和 16NRPS 基因簇负责次级代谢产物[10]。 转录组分析表明：里氏木霉的 CRE1 抑制 47.3%基因的转录，诱导 29.0%基因转录，17.2%的转录本不依赖 CRE1 而受生长速率调控[7]。而生防深绿木霉菌中碳代谢抑制如何参与其菌丝生长发育及代谢的研究尚属空白。本研究以深绿木霉 T23 为出发菌株，探究其碳代谢因子 CRE1 对其生长和产物合成代谢基因表达的影响，指导以 CRE1 为靶标，促进木霉菌细胞壁降解酶及生防相关次级代谢产物的合成和分泌，提高木霉菌生防效果。

1 材料与方法

1.1 菌种与引物

深绿木霉突变株（T23Δ*cre1*）与野生株（T23）均为上海交通大学木霉菌种资源保藏中心提供[11-12]。实验所用引物均由上海生工生物有限公司合成，引物序列如表 1 所示。

表 1 实验所用菌株与主要引物

Table 1 Strains and primers used in this study

菌株	特征	来源

T23		上海交通大学木霉菌菌种保藏管理中心
T23*Δcre1*	T23 菌株缺失 *cre1* 基因突变株	同上
qRT-PCR 引物	序列（5`-3`）	
NRPS1-F	GATGAGACCACGCTTTCC	
NRPS1-R	TATAGCACCCGGTAAGTCG	
NRPS2-F	ACAAAATTGCGCGAGACGAAC	
NRPS2-R	ATTCACTTCAGGCACTCGGAT	
NRPS3-F	TAGTCTCGCCGCAGAAGCA	
NRPS3-R	GCAAGTTGTGATGAATAGTGT	
PKS1-F	AAGACAATCCAACCTATCGGGCCA	
PKS1-R	TCTGCAACATCACAAGGCACAACG	
PKS2-F	CGCGCAACTTCAACGCTCTTACAA	
PKS2-R	TCATAGGCACAAATACCTCCCGCA	
Chit42-F	TTCCCGCAAGCAAGAT	
Chit42-R	GTAGTCCCAAATACCGTTC	
Glu-F	GAGACCAACTACGACCAGG	
Glu-R	TTTGTTTCCATCGCACC	

1.2 菌丝生长与产孢情况对比

选取长满菌丝的 PDA 培养基平板，用直径 0.5cm 的打孔器打孔后，挑取 T23 和 T23Δ*cre1* 的菌饼接种至新 PDA 平板。静置 30min 后，于 28℃恒温培养箱倒置培养 10 天，比较菌株生长和产孢情况。

1.3 菌株碳源、氮源利用差异分析方法

以 SM 作为基础培养基，分别添加等摩尔的碳源：葡萄糖和甘油，配置 SMGu/SMGy 培养基：680 mg KH_2PO_4，870 mg K_2HPO_4，1.7 g $(NH_4)_2SO_4$，200 mg KCl，200 mg $CaCl_2$，200 mg $MgSO_4 \cdot 7H_2O$，2 mg $FeSO_4$，2 mg $MnSO_4$，2 mg $ZnSO_4$，20g 葡萄糖（SMGu）或 40g 甘油（SMGy），加水定容至 1L，pH 6.0。将有机氮源蛋白胨替代无机铵盐，配置氮源培养基 PNGu/PNGy 培养基：10g 蛋白胨，5gNaCl，20g 葡萄糖（PNGu）或 40g 甘油（PNGy），加 ddH_2O 定容至 1L，pH6.0。高压蒸汽灭菌后，制备平板，接种后每天测量菌落直径并观察菌丝生长情况。

1.4 酶活快速测定方法

几丁质酶活：制备基础培养基：$MgSO_4.7H_2O$ 0.3g，$(NH_4)_2SO_4$ 3g，KH_2PO_4 2g，一水柠檬酸 1.0g，琼脂 15g，Tween-80 200μL，胶体几丁质 4.5g，溴甲酚紫 0.15g，

pH4.7，121℃灭菌 15min，制平板；接种木霉菌菌饼，25±2℃培养，观察菌落色泽。

β-1,3-葡聚糖酶活：配制 100mL MM 培养基，补充 0.05g 葡萄糖、0.067g 酵母浸膏；加入苯胺兰（aniline blue）6mg，茯苓聚糖（pachyman）400mg，pH 调至 6.8，然后加入 1.2g 琼脂；121℃灭菌 15min，制平板；接种木霉菌菌饼，培养 3 天，观察菌饼周围是否有透明圈。发酵液中几丁质酶活性测定方法参见参考文献[13]。几丁质酶诱导培养基：NH_4NO_3 3 g，KH_2PO_4 2 g，$MgSO_4·7H_2O$ 0.6g，$FeSO_4·7H_2O$ 0.1 g，20%（v/v）胶体几丁质，用 ddH_2O 定容至 1L。β-1,3-葡聚糖酶活性测定参照 DNS 方法[14]，10μL 酶液、20μL 0.25%海带多糖混合 40℃热循环仪静置 15min，加入 100μL DNS 试剂，95℃下静置 5min，25℃下冷却 2min，取 100μL 反应混合液在 540nm 测定吸光度。

纤维素酶活：将木霉菌株在 PDA 培养基上于 28℃下培养 5 天，用打孔器从菌落边缘取菌落小块，放置于产纤维素酶菌株培养基平板上，28℃下培养 4 天。用 0.1%刚果红染液覆盖平板，静置 30min，用 1mol/L NaCl 洗 1 小时，观察是否有水解透明圈。液体培养基：CMC 10g, $(NH_4)_2SO_4$ 4g， KH_2PO_4 2g，$MgSO_4·7H_2O$ 0.5g，蛋白胨 1.0g，琼脂 16g，去氧胆酸钠 0.5g，加水 1000mL，121℃高压灭菌 15min 备用。

蛋白酶活：制备 8.0% 动物明胶（sigma）水溶液，灭菌后加入 50℃、pH6.0 的 PDA 培养基内，制明胶固体培养基平板。平板上接种木霉菌菌片，室温下培养 3 天，观察菌落周围是否有透明圈。

1.5 深绿木霉总 RNA 提取与反转录

木霉菌丝快速抽滤后，液氮研磨，提取 RNA。参照 RNAprep Pure Plant Kit（天根）说明书操作。cDNA 第一链合成：参考 Takara 公司 RT-PCR 试剂盒。反转录体系 10 μL：5×PrimeScript Buffer 4 μL，PrimeScript RT Enzyme Mix 1 μL，Oligo dT Primer (50 μM) 1 μL，Random 6 mers (100 μM) 1μL，总 RNA 样品 500 ng，最后加无 RNase 水补足至 20 μL。混匀后于 37 ℃水浴 15 min，85 ℃热变性 5s，立即使用或者于-80 ℃冷冻保存。

1.6 荧光定量 PCR

按照 TOYOBO SYBR Green® Realtime PCR Master Mix -Plus-试剂盒说明操作，仪器为德国艾本德公司 realplex 4s。PCR 体系 25 μL：12.5 μL SYBR Premix Ex Taq，1 μL 正向引物，1 μL 反向引物，1 μL cDNA 模板。PCR 反应条件：95℃预热 30 sec；95℃，20 sec；56℃，30 sec；72℃，20 sec；供给 40 个循环。*β-actin* gene (154bp)为内参基因，前期通过 PCR 条件优化，使得目的基因和内参基因的扩增效率 E 基本一致，采用 $2^{-\triangle\triangle CT}$ 方法计算基因的相对表达量。

$$\text{Relative mRNA} = 2^{-((Ctt-Ctti)-(Ctw-Ctwi))}$$

其中 Ctt = 目标基因 Ct 值，Ctti = 目标基因内参 Ct 值，Ctw = T23 Ct 值，Ctwi = T23 内参 Ct 值。

2 结果讨论

2.1 深绿木霉 *cre1* 基因影响菌丝生长与发育

T23*Δcre1* 与 T23 分别置于 PDA 平板上相同条件培养 10 天，观察其在平板上生长情况。图 1 中可见，*cre1* 基因突变后，菌丝生长受到影响，生长速度明显下降，产孢滞后且产孢量下降，通过血球计数板测定培养第 8 天孢子数量，T23 产孢量为 1.41×10^{10}，而 T23*Δcre1* 为 1.45×10^{9}，基本下降一个数量级。证实在葡萄糖存在条件下，T23 中优先利用葡萄糖代谢生长，生长旺盛，而 T23*Δcre1* 表现为生长缓慢，菌丝形态纤细和密集，失去了代谢葡萄糖能力。说明 *cre1* 促进菌株生长，对菌丝形态有显著的调控作用。

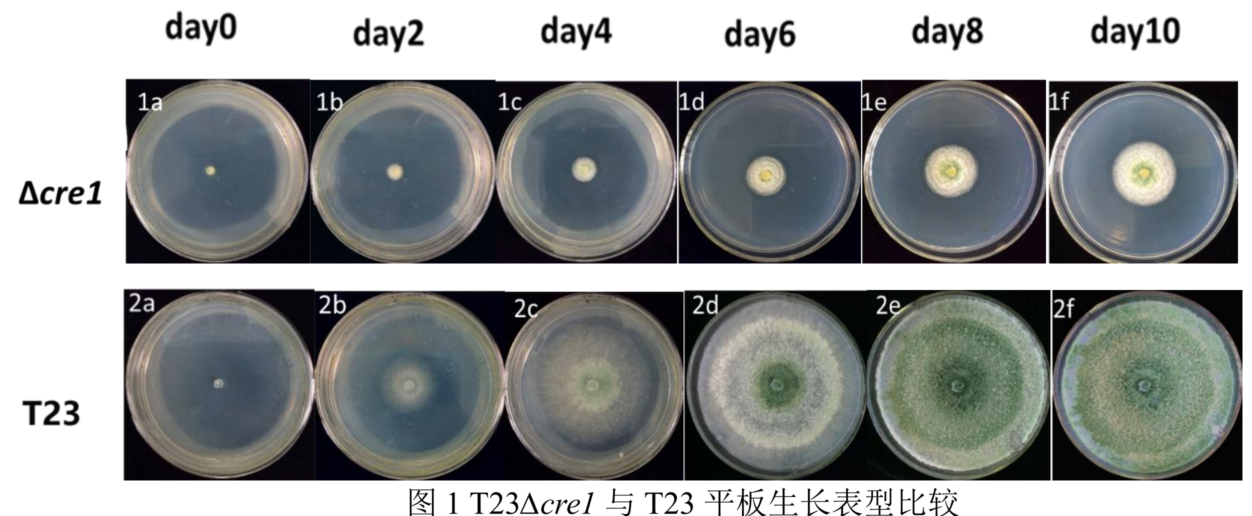


图 1 T23Δ*cre1* 与 T23 平板生长表型比较

Fig.1 Phenotypic comparison between T23Δ*cre1* and T23 on plate

2.2 CRE1 介导的木霉菌对碳源利用的差异

进一步探究碳代谢抑制因子 CRE1 如何响应碳源的变化，以 SM 作为基础培养基，选用六碳糖葡萄糖或三碳糖甘油作为碳源，在平板上接种等量的菌丝体后置于 28℃黑暗培养 10 天，比较菌株生长和产孢状况，图 2 所示。

T23 和 T23Δ*cre1* 在不同碳源（葡萄糖和甘油）条件下生长各异。葡萄糖作为抑制性碳源，在碳代谢抑制因子 CRE1 存在的 T23 中被优先利用。与在甘油中相比，T23 在含有葡萄糖的培养基中生长相对较快。T23Δ*cre1* 由于缺失了碳代谢抑制因子 CRE1，其碳源代谢酶类和氧化还原系统的调控出现了异常，导致 T23Δ*cre1* 生长速度非常缓慢。但 T23Δ*cre1* 在甘油中生长明显快于在葡萄糖作碳源的培养基中，说明 CRE1 敲除后菌株对三碳甘油代谢能力增强。

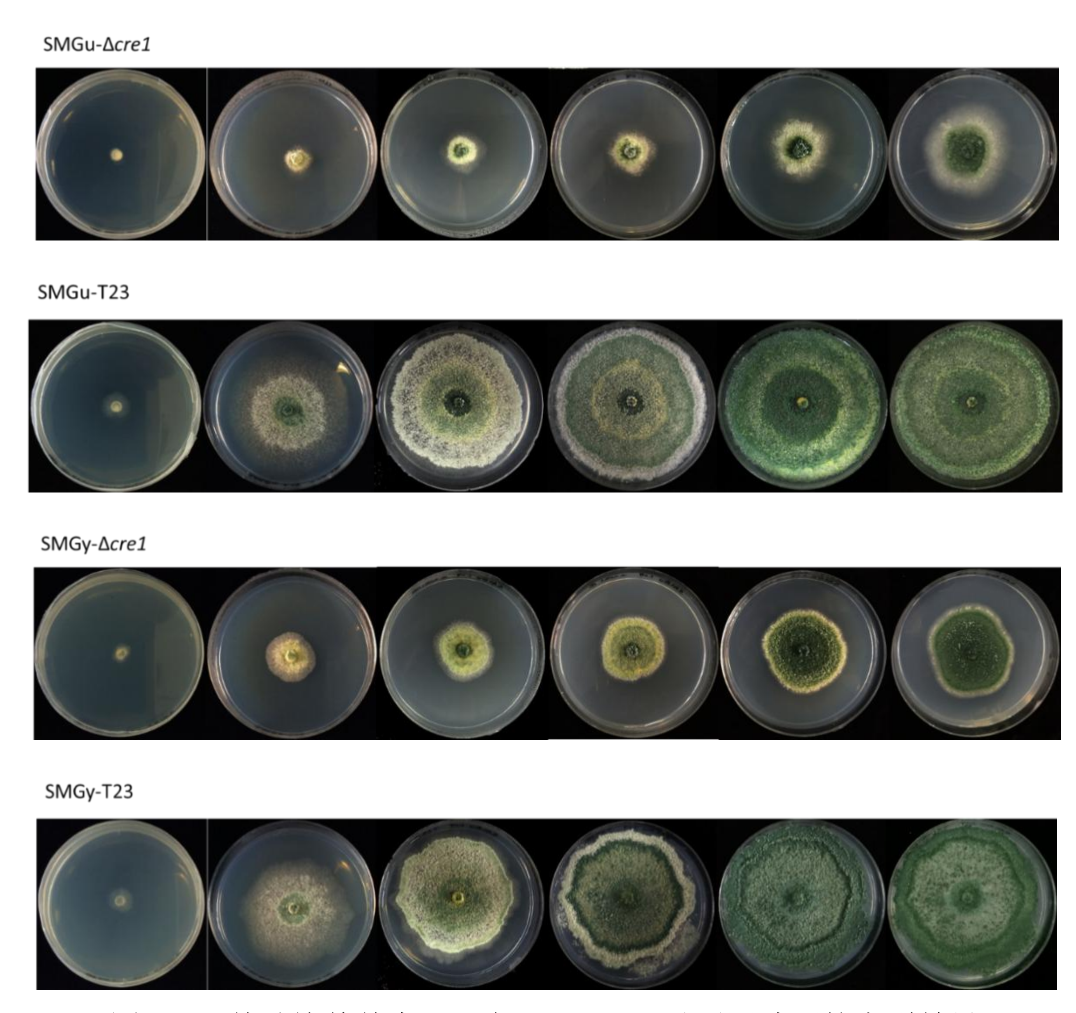


图 2 SM 基础培养基中 T23 与 T23Δ*cre1* 对不同碳源的表型差异

Fig.2 The phenotypic differences between T23 and T23Δ*cre1* when cultured on SM medium with diverse carbon sources

2.3 CRE1 介导调控对有机氮源利用的差异

T23 和 T23Δ*cre1* 在蛋白胨作为唯一氮源的 PN 培养基上菌丝形态和产孢情况存在较大差异。两种菌株在有机氮培养基 PN 中生长较无机氮的 SM 中快，如图 2 和图 3 中所示，气生菌丝茂盛，产孢延迟；T23 孢子量较少，偏黄色，而 T23Δ*cre1* 产孢较多且颜色偏绿。在 SM 培养基中，由于培养基中氮源含量较少，随着菌丝的向外扩展，孢子逐渐产生，产孢量大，且产绿色孢子。说明氮源影响孢子萌发的时间和伴随孢子形成分泌的色素物质。

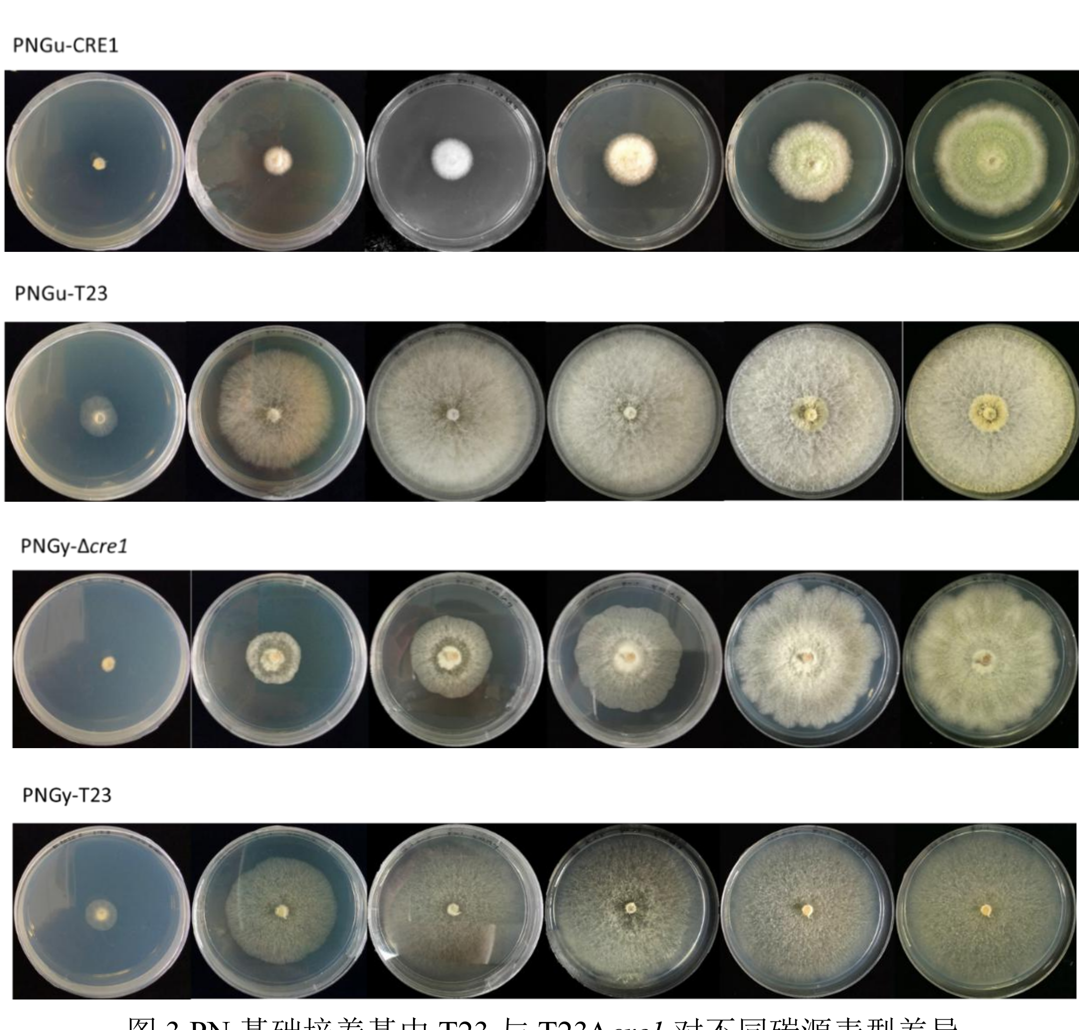


图 3 PN 基础培养基中 T23 与 T23Δ*cre1* 对不同碳源表型差异

Fig.3 The phenotypic differences between T23 and T23Δ*cre1* when cultured on PN medium with diverse carbon sources

2.4 碳源与氮源对菌丝生长速度的影响

比较碳源和氮源对 T23 和 T23Δ*cre1* 菌丝生长速度的影响，结果如图 4 所示。PN 培养基中，T23Δ*cre1* 优先利用甘油进行生长，生长速度快于其在葡萄糖中，

而 T23 在两种碳源中生长基本没有差异（图 4a）。SM 培养基中，T23Δ*cre1* 在甘油和葡萄糖两种碳源中生长趋势相似，培养第 6 天，菌落直径达到 4cm，较 T23 的生长速度明显减缓，T23 生长到第 6 天菌落直径达到 9cm，是 T23Δ*cre1* 的 2 倍（图 4b）。PN 培养基以蛋白胨为主要氮源，营养较为丰富，而 SM 培养基以无机盐$(NH_4)_2SO_4$为主要氮源。T23 和 T23Δ*cre1* 分别在 PNGu 和 SMGu 中生长趋势相似，说明碳源为葡萄糖时，*cre1* 对氮源的变化反应不敏感（图 4c）。而碳源为甘油时，尽管在同一培养基中 T23 的生长速度明显高于 T23Δ*cre1*，但 T23Δ*cre1* 在 PNGy 培养 4 天后明显比在 SMGy 中生长速度快（图 4d）。因此 *cre1* 敲除影响了菌丝正常的生长，但提高了甘油代谢酶活的表达水平提高，有利于深绿木霉利用甘油进行生长代谢。

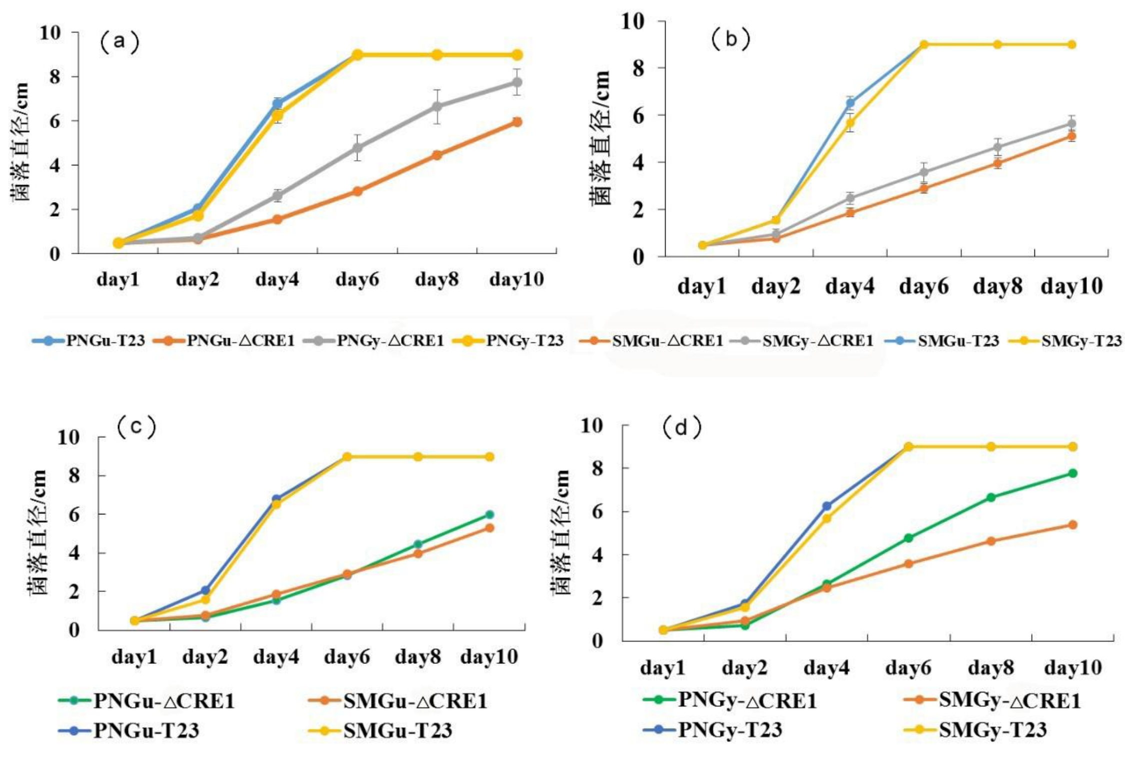


图 4 PN 与 SM 培养基中 T23Δ*cre1* 与 T23 的菌丝生长情况

Fig.4 The mycelia growth of T23Δ*cre1* and T23 on PN and SM medium

2.5 CRE1 影响几种酶活性分析

2.5.1 几丁质酶与β-1,3-葡聚糖酶活性分析

通过平板定性分析比较 T23 和 T23Δ*cre1* 的几丁质酶活性，结果如图 5a 所示，培养基的颜色深浅代表几丁质酶活性的高低。T23Δ*cre1* 在培养后期培养基颜色

由中间向外延逐渐变成紫色，至第 8 天时平板全部变成深紫色，表明其几丁质酶活性非常高。而 T23 培养基一直是本底颜色，没有变成紫色，且生长速度也较 T23Δ*cre1* 慢。β-1,3-葡聚糖酶活定性分析表明，T23 和 T23Δ*cre1* 培养至其长满平板并全部产孢，均没有出现透明圈（图 5b）。T23Δ*cre1* 的菌丝生长和产孢均成水晕状，平板背面也有明显的纹路，而 T23 正面表型纹路不明显。

测定发酵 6 天后发酵液中的几丁质酶活和β-1,3-葡聚糖酶活（图 5c），结果表明：T23Δ*cre1* 的几丁质酶和葡聚糖酶活性显著高于 T23。当 *cre1* 基因敲除以后，碳代谢抑制对于几丁质酶和葡聚糖酶表达的抑制解除，酶活表达量上升，酶活提高。与之相一致，T23Δ*cre1* 中两种酶活编码基因 *chit42* 和 *glucanase* 转录活性分别比 T23 中提高 2 倍和 4 倍左右（图 5d）。

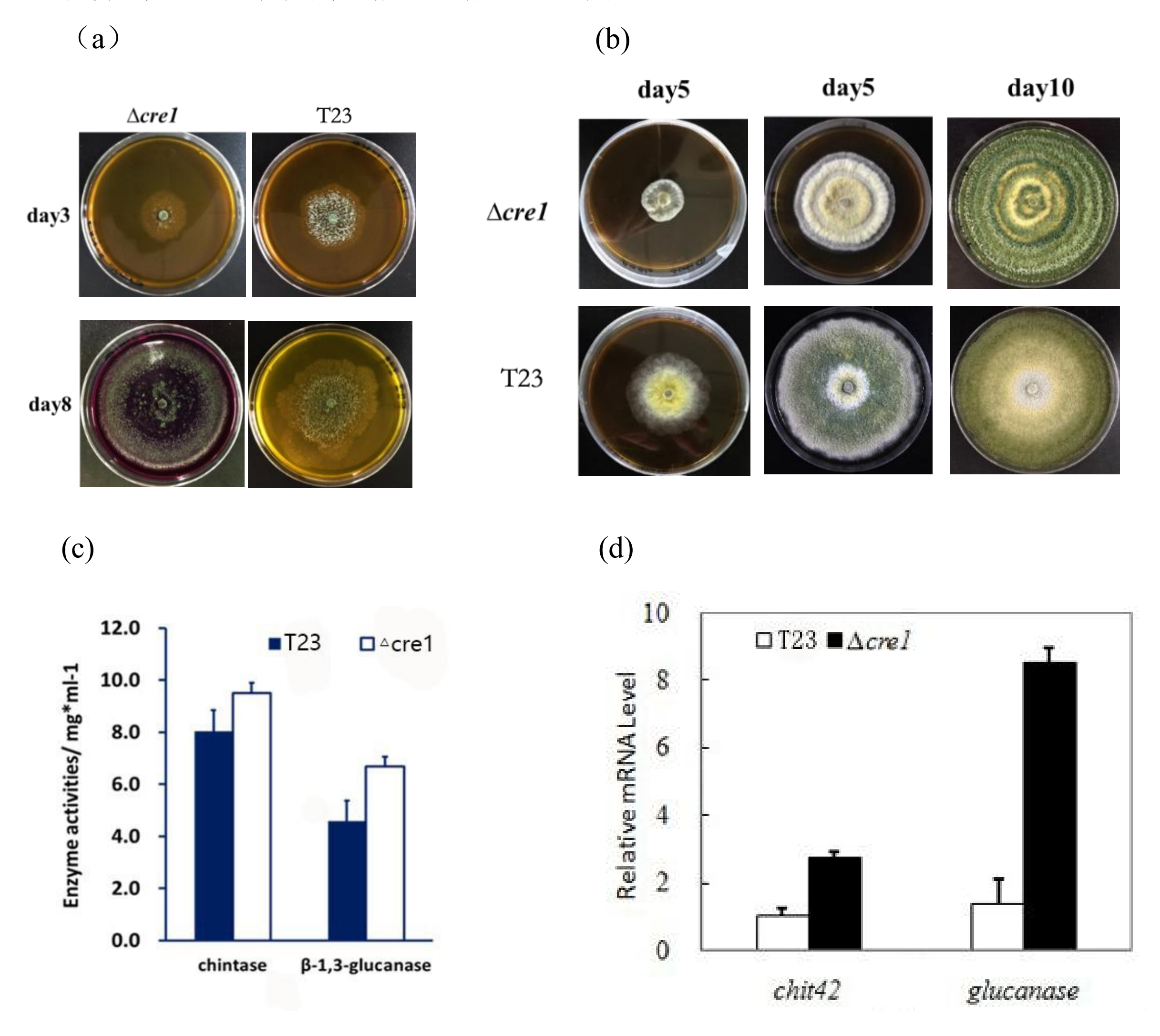


图 5 *cre1* 对几丁质酶活与葡聚糖酶活的影响

(a)几丁质酶活平板检测；(b)β-1,3-葡聚糖酶活平板检测；(c)液体发酵几丁质酶活与葡聚糖酶活测定；(d)qRT-PCR 测定几丁质与葡聚糖酶活基因转录活性

Fig.5 Effect of *cre1* on chitinase and β-1,3-glucanase activity
(a) Chitinase activity assay on plate; (b)β-1,3-glucanase activity assay on plate; (c)The enzyme activity of chitnase and β-1,3-glucanase after fermentation; (d)Expression levels of chitinase and β-1,3-glucanase genes.

2.5.2 纤维素酶与蛋白酶活检测

对纤维素酶、蛋白酶进行平板酶活测定，透明圈的大小代表酶活性的高低。结果如图 6 所示，T23Δ*cre1* 虽生长速率慢于 T23，但在产纤维素酶菌株培养基（图 6a）和明胶培养基（图 6b）上均出现了明显的透明圈，说明突变株Δ*cre1* 虽然生长缓慢但其代谢旺盛，酶活水平较高。而 T23 在两种培养基中均并没有显示出明显的透明圈，显示其纤维素酶和蛋白酶酶活水平低。说明 *cre1* 基因对于纤维素酶和蛋白酶的表达有一定抑制作用。

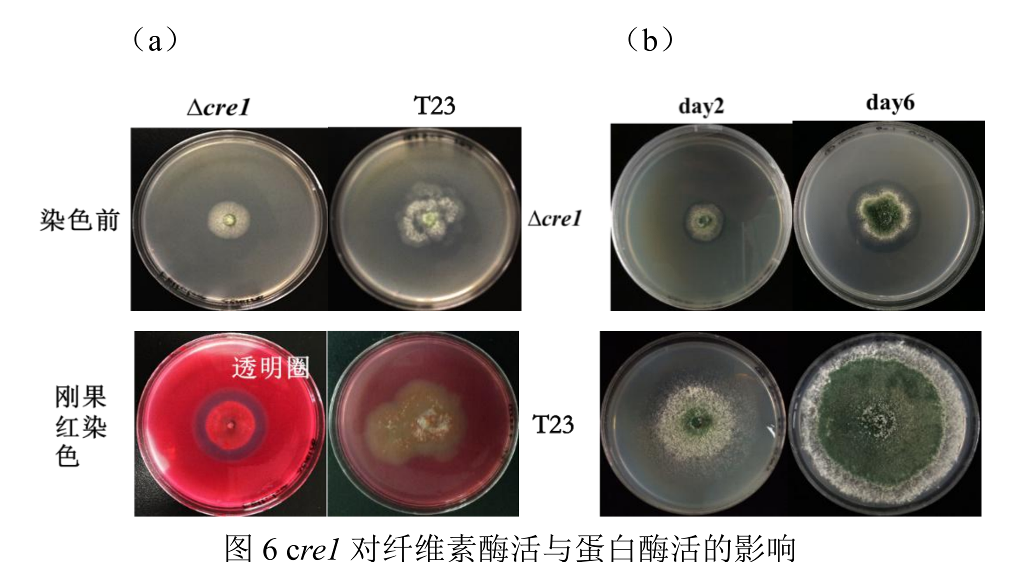


图 6 *cre1* 对纤维素酶活与蛋白酶活的影响
(a) 纤维素酶活；(b) 蛋白酶活.
Fig.6 Effect of *cre1* on cellulase and protease activity
(a) Enzyme activity of cellulase; (b) Enzyme activity of protease.

2.6 CRE1 影响木霉菌生防次级代谢产物的合成

木霉菌中合成 100 多种多样性的代谢产物，如聚酮类，萜烯类，抗菌肽等，具有广谱独特的抗菌活性，负责合成产物的酶主要是非核糖体肽合酶（Non-ribosomal peptide synthase）和聚酮合酶（Polyketide synthase）[15-16]。从深绿木霉菌的基因组（https://genome.jgi.doe.gov/Triat1/Triat1.home.html）中选择了 3 个 NRPS 编码基因及 2 个 PKS 编码基因。利用 qRT-PCR 方法考察 *cre1* 对上述 5 个基因转录水平表达的调控模式。

表 2 CRE1 对 NRPSs 与 PKS 编码基因转录水平的影响

Table 2 Effect of CRE1 on NRPSs and PKSs coding genes transcription

ID	gene	T23(*T.atroviride*)			Δ*cre1* (*T.atroviride*)			**Fold**[a]
		CT *β-actin*	**CT** T23	**ΔCT** T23	**CT** *β-actin*	**CT** Δ*cre1*	**ΔCT** Δ*cre1*	
48813	*NRPS1*	20.04±0.30	31.24±0.31	11.20	22.33±0.42	34.42±0.30	12.09	0.54
52932	*NRPS2*	20.04±0.30	32.52±0.74	12.48	22.33±0.42	31.69±0.16	9.36	8.72
39887	*NRPS3*	20.40±0.40	26.02±1.27	5.98	22.33±0.30	28. 15±0.12	5.82	1.12
33092	*PKS1*	20.04±0.30	29.73±014	9.69	22.33±0.42	31.77±0.01	9.44	1.19
79	*PKS3*	20.04±0.30	26.46±0.29	6.42	22.33±0.43	27.22±0.24	4.89	2.88

注：a. $2^{-\Delta(\Delta CT\ T23-\Delta CT\ \Delta cre1)}$

定量结果如表 2 所示：3 个 NRPS 编码基因中，Cre1 突变后导致 NRPS2 表达量提高了 8.72 倍，而 NRPS1 表达量为原来 1/2，NRPS3（铁载体合成酶）变化不显著，因此 CRE1 显著抑制 NPRS2 表达。尽管基因组 NRPS1 和 NRPS2 的功能注释不完善，但不同 NRPS 负责合成不同类的代谢产物，CRE1 区别性的调控非核糖体肽合酶，间接影响次级代谢产物分泌。CRE1 对聚酮合成酶 PKS1 和 PKS3 具有抑制作用，其中 PKS3 是分生孢子色素形成基因。*cre1* 突变后，PKS3 表达量提高 3 倍，说明 *cre1* 抑制孢子色素形成，未来将进一步以 *cre1* 为靶标，构建 *cre1* 过表达菌株，促进其代谢产物和分生孢子色素形成。

3 结论

通过比较野生株 T23 和突变株 T23Δ*cre1* 在碳源和氮源的生长差异及代谢产物表达的变化，确定碳代谢抑制因子 CRE1 对木霉菌生长和代谢产生多效性影响，结果表明：（1）CRE1 明显抑制了木霉菌菌丝的生长且具有营养依赖性，T23Δ*cre1* 的生长速率均小于 T23，但更易代谢甘油；（2）CRE1 抑制木霉菌的几丁质酶，葡聚糖酶、纤维素酶和蛋白酶的活性，同时抑制几丁质酶和β-1,3-葡聚糖酶编码基因转录；（3）CRE1 影响木霉菌重要抗菌次级代谢产物的合成，对代谢产物合成相关的非核糖体肽合成酶 NRPSs 和聚酮合成酶 PKSs 主要起到抑制作用。

本研究仅选择了 3 个 NRPSs 和 2 个 PKSs 合成酶基因，并未追溯其基因组位置及具体的次级产物合成基因簇位置，因此碳代谢抑制对 NRPSs、PKSs 的精细调控机制，及代谢产物合成的影响仍需深入研究。CRE1 作为多效性的转录调控因子，促进木霉菌的生长和代谢，区别性调控代谢产物合成酶表和达的调控，增加木霉菌不同环境中适应性，指导有目的改良木霉菌提高其生防特性。

参考文献

[1] Woo S L, Lorito M. Exploiting the interactions between fungal antagonists, pathogens and the plant for biocontrol. In: Vurro M, Gressel J (eds). Novel Biotechnologies for Biocontrol Agent Enhancement and Management. NATO Security through Science Series: Springer, Dordrecht, 2007, 107-130. doi: 10.1007/978-1-4020-5799-1_6

[2] Keswani C, Mishra S, Sarma B K, et al. Unraveling the efficient applications of secondary metabolites of various *Trichoderma* spp. Appl Microbiol Biotechnol, 2014, 98(2):533–544.

[3] Mach R L, Strauss J, Zeilinger S, et al. Carbon catabolite repression of *xylanase I* (*xynl*) gene expression in *Trichoderma reesei*. Molecular Microbiology, 1996, 21 (6): 1273-1281.

[4] Würleitner E, Pera L, Wacenovsky C, et al. Transcriptional regulation of *xyn2* in *Hypocrea jecorina*. Eukaryotic Cell, 2003, 2(1): 150-158.

[5] Silva-Rocha R, Castro L D S, Antonieˆto A C C, et al. Deciphering the Cis-Regulatory Elements for XYR1 and CRE1 Regulators in *Trichoderma reesei.* PLOS ONE, 2014, 9(6): e99366. doi: 10.1371/journal.pone.0099366.

[6] Carsolio C, Gutie´rrez A, Jime´nez B, et al. Characterization of *ech-42,* a *Trichoderma harzianum* endochitinase gene expressed during mycoparasitism. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91(23): 10903–10907.

[7] Portnoy T, Margeot A, Linke R, et al. The CRE1 carbon catabolite repressor of the fungus *Trichoderma reesei*: a master regulator of carbon assimilation. BMC Genomics, 2011, 12: 269.

[8] Vinale F, Marra R, Scala F, et al. Major secondary metabolites produced by two commercial *Trichoderma* strains active against different phytopathogens. Lett Appl Microbiol, 2006, 43(2): 143–148.

[9] Mukherjee P K, Horwitz B A, Herrera-Estrella A, et al. *Trichoderma* research in the genome era. Annu Rev Phytopathol, 2013, 51: 105–129.

[10] Atanasova L, Le Crom S, Gruber S, et al. Comparative transcriptomics reveals

different strategies of *Trichoderma mycoparasitism*. BMC genomics, 2013, 14: 121.

[11]孙瑞艳. 中国南方地区木霉菌资源收集、鉴定与生防功能评价研究. 上海：上海交通大学，农业与生物学院，2013.

Sun R Y. Study on the collection, identification and biocontrol function evaluation of *Trichoderma* species in southern China. Shanghai: Shanghai Jiao Tong University, School of Agriculture and Biology, 2013.

[12]周于聪. 改良 ATMT 转化技术在深绿木霉基因敲除中的应用. 中国生物工程杂志，2015.35 (12): 58-64.

Zhou Y C. Application of improved ATMT transformation in gene knock-out of *Trichoderma atroviride*. China Biotechnology, 2015, 35 (12): 58-64.

[13]Wu Q, Bai L, Liu W, et al. Construction of a *Streptomyces lydicus* A01 transformant with a *chit42* gene from *Trichoderma harzianum* P1 and evaluation of its biocontrol activity against *Botrytis cinerea*. J Microbiol, 2013, 51(2): 166-173.

[14]Miller G L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal Chem, 1959, 31(3): 426–428.

[15]王世媛. 非核糖体肽合成酶(NRPSs)作用机理与应用的研究进展. 微生物学报，2007，47(4): 734-737.

Wang S Y. Research progress on mechanism and application of non-ribosomal peptide synthase (NRPSs) . Acta Microbiologica Sinica, 2007, 47(4): 734-737.

[16]Reino J L, Guerrero R F, Herna´ ndez-Gala´ n R, et al. Secondary metabolites from species of the biocontrol agent *Trichoderma*. Phytochem Rev, 2008, 7: 89–123.

Study on Functional Properties of Carbon Catabolite Repressor CRE1 in *Trichoderma atroviride* *

LI Pei-yi, ZHOU Yu-cong, LI Ya-qian[五], CHEN Jie

[五]Corresponding author, e-mail: lauren@sjtu.edu.cn

(School of Agriculture and Biology，Shanghai Jiao Tong University，Key Laboratory of Urban Agriculture (South) Ministry of Agriculture， Shanghai 200240，China)

Abstract

The genus *Trichoderma* comprises a large number of strains found in multitude of ecological niches. Some of them have been developed as biocontrol agents against plant diseases, which can antagonize plant pathogens and facilitate the growth of plants at the same time, showing an important value for biocontrol in agriculture.

Carbon catabolite repression (CCR) is a wide-domain regulatory circuit, allowing the preferred assimilation of carbon sources of high nutritional value over others. CCR is mediated by the Cys2His2 type transcription factor CreA/CREI that have been cloned from numerous filamentous fungi. The latest studies have found that CRE1, the carbon catabolite repressor, regulates cell growth and metabolic procedures of *Trichoderma* spp., which would be helpful for strains' antagonism against various pathogens and their own survival at different habitats.

On basis of wide type strain *T.atroviride* 23, T23 and its *cre1* knock out mutant strain T23*Δcre1* kept in laboratory, the phenotypic assays and function analysis of both strains have been carried out on different mediums to draw the following conclusions. Firstly, the *cre1* gene in *Trichoderma* is essential for the growth and sporulation of *T.atroviride.* When *cre1* is knocked out, the growth rate of T23*Δcre1* slows down, and its sporulation apparently lags behind that of T23 with the number of spores reduced an order of magnitude; Furthermore, the response of T23*Δcre1* to carbon soures and nitrogen sources are diffirent from those of T23. The results further indicate *cre1*-mediated regulation of growth and formation of sporulation depends on specific culture. Secondly, how CRE1 regulates the expression of some cell-wall degraditon enzymes, such as chitnase, β-1,3-glucanase, protease and cellulase, is detected. Results of enzyme activity assay on plate and qRT-PCR show that CRE1 represses the expression of the chitianse and β-1,3-glucanase obviously. In line with that, transcription activity of two enzyme activity encoding genes, *chit42* and *glucanase,* respectively increase by 2 times and 4 times in T23*Δcre1* compared with in T23. Enzyme activity comparison of cellulase and protease conducted on plate also

indicates a higher activity level in T23*Δcre1* rather than in T23. Finally, the regulation of CRE1 on the expression of several non-ribosomal peptides synthases (NRPSs) and polyketide synthases (PKSs), which is found in charge of the synthesis of most valuable secondary metabolies for biocontrol, are deterimined. According to results of qRT-PCR, CRE1 plays a complicate role in the regulation on the transcription of NRPSs and PKSs. Among the three choosen NRPS encoding genes, the knock out of *crel* results in an increase of 8.72-fold expression of NRPS2, while NRPS1 expression is reduced to 1/2 and expression of NRPS3 is not significantly changed. Also, expression of PKS3 coding conidia pigment formation in T2*3Δcre1* increases by 3 times that in T23， and PKS1 expression is detected being inhibited in T23. Thus, CRE1 indirectly affects the synthesis and secretion of *Trichoderma* secondary metabolites.

In conclusion, carbon catabolite repressor CRE1 regulates mycelia growth, secondary metabolites biosynthesis, which is exactly of great importance in biocontrol procedure of *T.atroviride.* And those findings are pretty valuable for controlling synthesis and secretion of metabolites of *T.atroviride* and further to improve its biocontrol effects.

Key words: *Trichoderma atroviride* 23；Carbon catabolite repressor CRE1；Growth；Enzyme activity characteristics； Secondary metabolism synthesis genes